

DE 00/1944

REC'D 16 AUG 2000

WIPO PCT

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)



4

**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Gebrauchsmusteranmeldung**

Aktenzeichen: 299 09 998.9

Anmeldetag: 12. Juni 1999

Anmelder/Inhaber: Thomas Roitsch, Regensburg/DE

Bezeichnung: Promotorsystem, dessen Herstellung und
Verwendung

IPC: H 02 K 1/00

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Gebrauchsmusteranmeldung.

München, den 18. Juli 2000
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Faust



3

Promotorsystem, dessen Herstellung und Verwendung

Beschreibung

Die Erfindung bezieht sich auf die Genexpression und die Regulation von Genexpression in Pflanzen. Im Speziellen bezieht sich die Erfindung auf DNA-Promotor-Sequenzen, und auf Expressionskassetten, die in Pflanzen eingeführt werden können, um die Transkription einer benachbarten kodierenden Sequenz zeitlich und räumlich innerhalb der Pflanzen zu regulieren. Zusätzlich bezieht sich die Erfindung auf Expressionsvektoren, die solch eine Expressionskassette enthalten und die benutzt werden können, um Pflanzen zu transformieren.

Hintergrund zu der Erfindung

Ein Promotor ist eine DNA-Sequenz, die Expressionsort und -menge eines Genes beeinflusst oder bestimmt, und die Stellen für die Bindung der RNA-Polymerase zur Verfügung stellt. Die Position eines Promotors ist im Genom eines Organismus relativ zum Transkriptionsstartpunkt fixiert. RNA-Polymerase ist ein Enzym, das an den Promotor binden kann und die Transkription eines Genes vollzieht, das unter der Kontrolle dieses Promotors steht. Dabei entsteht die messenger-RNA, die wiederum zur Synthese des Proteines verwendet wird.

Promotoren sind in verschiedenen Organismen untersucht worden. Für bestimmte Spezies konnten konservierte DNA-Bereiche (sog. Consensus-Sequenzen) innerhalb von Promotoren gefunden werden, die mit verschiedenen Genen assoziiert sind. Von diesen Bereichen wird angenommen, daß sie in die Rolle, die der Promotor im Transkriptionsprozeß spielt, eingebunden sind.

Die Initiation des Transkriptionsprozesses in Pflanzen schließt eine Interaktion des Promotors mit der RNA-Polymerase II ein. Innerhalb von Pflanzenpromotoren wurden Consensus-Sequenzen oberhalb des 5'-Endes des Transkriptionsstartpunktes gefunden. Eine dieser Sequenzen ist etwa 7 Basenpaare lang und befindet sich etwa 20-30 Basenpaare oberhalb des Transkriptionsstartpunktes. Diese Sequenz ist als sog. TATA-box bekannt und es wird angenommen, daß sie eine Rolle bei der RNA-Polymerase Bindung spielt. Eine andere Sequenz mit einer Länge von ungefähr 9 Basenpaaren ist etwa 70-90 Basenpaare oberhalb des Transkriptionsstartpunktes zu finden. Diese Sequenz wird CAAAT-box genannt und es wird angenommen, daß sie in der Regulation des Transkriptionslevels eine Rolle spielt. Es wurden noch andere Regionen oberhalb des Transkriptionsstartpunktes identifiziert, die die Häufigkeit der Transkriptionsinitiation in Eukaryonten beeinflussen. Diese DNA-Bereiche, die Enhancer genannt werden, beeinflussen die Aktivität von Promotoren in ihrer Nachbarschaft. Diese Sequenzen sind jedoch der Definition nach keine Promotoren, da ihre Position nicht fixiert sein muß.

Um ein fremdes Gen in einem Organismus, z.B. einer Pflanze, exprimieren zu können, muß die kodierende Sequenz dieses Genes unter die Kontrolle eines Promotors gestellt werden und in die Pflanze eingebracht werden. Zur Insertion des zu exprimierenden Genes in das Pflanzengenom wird die fremde DNA meistens in das Ti-Plasmid von *Agrobacterium tumefaciens* gebracht, und dieses wird dann verwendet um die Pflanzen zu transformieren. Eine zweite häufig verwendete Methode ist die direkte Transformation von DNA z.B. mit Hilfe der sogenannten "particle gun". In den meisten Fällen werden hierfür bisher aus Bakterien isolierte Promotoren oder Promotoren von Pflanzenviren verwendet, die zur Expression des fremden Genes in den Pflanzen führen. Diese Promotoren haben den Nachteil, daß sie artfremd sind und daher den Kontrollmechanismen innerhalb der Pflanzen nicht unterliegen.

Bei Verwendung eines pflanzlichen Promotors ist die Expression eines fremden Genes möglich, die somit auch den pflanzlichen Kontrollmechanismen unterliegt. Durch Untersuchungen der Expression des Genes, vor dem der Promotor ursprünglich liegt, lassen sich genaue Kenntnisse über die Expressionsstärke, die Zeit, zu der das Gen exprimiert wird, und den Expressionsort sammeln, die auf die Expression eines fremden Genes, das unter die Kontrolle dieses Promotors gestellt wird, weitgehend übertragbar sind. Ein weiterer Vorteil ist, daß bei Verwendung eines genau charakterisierten, pflanzlichen Promotors gezielte Eingriffe und Untersuchungen in die Entwicklung bestimmter Pflanzenteile möglich ist.

Im vorliegenden Fall wurde der Promotor einer Invertase aus Tabak kloniert, die in sehr großen Mengen, aber nur in einem bestimmten Entwicklungsstadium und hochspezifisch, nur in den Antheren exprimiert wird. Zur Klonierung des Promotors wurde eine genomische Bank aus Tabak mit einer Sonde aus dem kodierenden Bereich der untersuchten Invertase durchsucht. Die erhaltenen genomischen DNA-Sequenzen wurden mit molekularbiologischen Methoden weiter charakterisiert und schließlich ein Klon isoliert, der die Promotorsequenz enthielt, die dann sequenziert wurde. Es wurden Expressionskassetten mit verschiedenen Genen hergestellt, die in *Agrobacterium tumefaciens* eingebracht wurden, um Tabakpflanzen damit zu transformieren. Dieses neue Promotorsystem kann nun dazu verwendet werden, fremde Gene in Pflanzen in einem bestimmten räumlichen und zeitlichen Rahmen zu exprimieren. Das Wort fremd meint dabei Gene, die nicht natürlich in Verbindung mit diesem Promotor vorkommen. Außerdem kann mit Hilfe dieses Promotorsystems die Expression von fremden und eigenen Genen in der Pflanze moduliert werden, d.h. Gene können überexprimiert oder reprimiert werden.

Ausführungsbeispiele:

1. Die Promotor-DNA-Sequenz, bestehend aus den 4300bp des 5' liegenden DNA-Bereiches, gezählt oberhalb vom Translationsstartpunkt der antherenspezifisch exprimierten Invertase aus Tabak, oder Teile davon, die dadurch gekennzeichnet sind, antherenspezifische Expression für dahinter gelegene Gene zu vermitteln, kann mit Hilfe molekularbiologischer Methoden so verändert werden, daß Restriktionsschnittstellen am 5'-oder 3'-Ende eingefügt werden.
2. Die wie in 1. veränderte Promotor-DNA-Sequenz oder Teile der Promotor-DNA-Sequenz können zur Herstellung einer Expressionskassette zur Expression fremder Gene in Pflanzen verwendet werden. So eine Expressionskassette ist dadurch gekennzeichnet, daß sie a) die Promotor DNA oder Teile davon aus 1. enthält; b) eine Verbindungs-DNA ohne spezielle Funktion bzw. fremde Gene, verbunden mit der ersten Schnittstelle beinhaltet; und c) eine 3'-Region, bestehend aus der 3'-Region eines eukaryontischen Genes enthält, wobei diese 3'-Region eine zweite Restriktionsschnittstelle an ihrem 5'-Ende besitzt und diese 3'-Region über diese zweite Restriktionsschnittstelle mit der Verbindungs-DNA bzw. den fremden Genen aus b) verbunden ist.
3. Eine Expressionskassette wie in 2. beschrieben, kann in einen Expressionsvektor kloniert werden. Dieser Expressionsvektor kann dazu verwendet werden, mit Hilfe verschiedener gängiger Methoden (z.B. Agrobakterien vermittelte Transformation; direkte Transformation) Pflanzen zu transformieren. Transgene Pflanzen können dann unter Bedingungen angezogen werden, unter denen das fremde Gen unter der transkriptionellen Kontrolle der beschriebenen Promotor-DNA-Sequenz exprimiert wird.
4. Die Promotor-DNA oder Teile davon können dazu verwendet werden, die Translation eines pflanzeigenen Genes zu modulieren. So kann die Expression eines Genes durch Einbringen weiterer Kopien unter der Kontrolle dieses Promotors gesteigert werden oder die Expression kann mit Hilfe der Antisense-Technik unterdrückt werden. Dazu muß die DNA-Sequenz des zu unterdrückenden Genes in "verkehrter Richtung" in eine Expressionskassette wie unter 2. beschrieben kloniert werden und wie unter 3. beschrieben in Pflanzen transformiert werden.

5. Die spezifischen Eigenschaften der Promotor-DNA-Sequenz bzw. von Teilen davon, ermöglichen in transgenen Pflanzen, die wie unter 3. beschrieben hergestellt wurden, eine zeitlich (nur während der Pollenbildung) und räumlich (nur in Antheren) definierte Expression von fremden Genen in Pflanzen.

6. Aufgrund des starken Expressionslevels der antherenspezifischen Invertase in Tabak, lassen sich mit Hilfe dieser Promotor-DNA-Sequenz bzw. mit Teilen davon, in transgenen Pflanzen große Mengen eines bestimmten Proteins zu einem bestimmten Zeitpunkt und in einem bestimmten Ort der Pflanze (siehe 5.) herstellen. Dieses Protein kann dann durch Ernte der Antheren, Aufschluß und für das hergestellte Protein spezifische Reinigungsverfahren in großen Mengen gewonnen werden.

7. Die Promotor-DNA-Sequenz, oder Teile davon, können dazu verwendet werden, in die Entwicklung der Antheren in Pflanzen einzugreifen. So können transgene Pflanzen hergestellt werden, bei denen beispielsweise durch Antisense-Expression von Invertasesequenzen die Proteinmengen für die extrazelluläre Invertase verringert werden. Dies kann zu männlich sterilen Pflanzen führen, die in der Landwirtschaft, bei der Herstellung von Hybridsaatgut von großer Bedeutung sind.

8. Die Promotor-DNA-Sequenz, oder Teile davon, können dazu verwendet werden, transgene Pflanzen herzustellen, die pflanzeneigene Stoffe in großer Menge herstellen, die positiv auf ihre Entwicklung, insbesondere betreffend den Ertrag von fruchtbaren Pflanzen, wirken können. Beispiele für solche pflanzeneigene Stoffe wären Wachstumshormone oder Proteine die zur Energieversorgung der wachsenden Gewebe (z.B. Invertasen, Zuckertransporter) notwendig sind.

Erreichte Vorteile:

Mit Verwendung dieses Promotorsystems steht ein Werkzeug zur Verfügung, mit dem man zeitlich und örtlich gezielt fremde Proteine in Pflanzen exprimieren kann und pflanzeneigene Gene in ihrem Expressionslevel modulieren kann.



Zeichnung 1: Promotor-DNA-Sequenz der extrazellulären Invertase aus Tabak

```

1   TCTAGAATGA CGCCACCGGC CAGGACGGGG AGTATGATTT CCCCGAATGT
51  TCGTTCAACT nCATTGTTAA AACCTGTTAG CGTGATGCAG CCCGGTACTA
101 TCTTATCCTC GAGTTTCATT TGTGCAAGTA CTCGAGGATG GACAATTCAC
151 GGGCCACTCC CATCGTCCAC CATAATGCGT CTTACATCTG TATCTAATAT
201 TCGTAAAGTG ATAACGAGGG CATCATAGTG AGGGAAAACC AAACCGTGGT
251 TATCTGACTT ATGGAAGATG ATACTTTCTT TAAGTTTCTC GTACCGTTCA
301 TGAGTGATTA ACTGTTTGAG CTTGTGGGTT GTGGCGAACT TTACGTTGTT
351 GATCGAAACG TCGTCTCCGC CCCCGATGAT AATGTGAATG GTGCGAGTCG
401 GTAAGGGTGG TTTEGGCGGT CCCTGGTGTT GTTCACGTCC TCGAGAAAAG
451 TTGGTCCTTC CTCGGTCACA CAACAATATT TTGAGGTGTC CTTGATGAAG
501 CATGTCCATG ACCTCTTGTC TTAGGGCGAT ACAATCCTCA GTTTTGTGAC
551 CTCGCTCTTG GTGGAACCTG CAGAGGGCAT CTGATTTTCT AGTGCTTGGA
601 TCTGACCTCA TCTTTTGTGG CCACTTTACT TTTGGTCCGA GCTTCTTCAA
651 TGCATAGACT ATTTCTGAGG GTGACACACA AAATTGTGTA GCGGATAGTA
701 AAGAGGGCAT ACCTCTCTCG TTCCGGTGAG TCCCTGTCCT TGGCCTAGAT
751 GGGCCCTCTT CGTAGCGGGA GAGGGGCATG ATGGCACTTT TGACATATGG
801 TTGATCCATT TCTCGGTTAG ATCATGGAGC TGCAAGATCT CTCTTGGCAT
851 CATTTTGACG ATCCTTCCTG GTTTCGGCTT GTACCGAGGT CAATCGATGA
901 GTTGGCCCAT TCAGGTCGTC TTCGTCGGCA CGGGCCTCAG CACAGTAGGC
951 GTTGTGTATT TCATCCCAAG TGGTGGGAGG ATATTTCATA AGTTGGTTTA
1001 ACAGTTTTCT GGTGCGCCTC GAGCCATTCA TGTTTCAGCCC ATTCTGGAAA
1051 GTTGCTACAA CCATTCCTTC TGATACATTC GGTAAGGTCA TCCTTACTCT
1101 GTTGAATCGA GCGAGGAAGT CCCTCAATCC CTCTCCGAGT GATTGTTTGA
1151 TGGCAAATAT ATCGTTCACT CTTGCCTCCG CGTTTTTAGC CCCAACATGG
1201 GCCATTATGA ACTTGTCGGC CATCTCTTCG AATATTTCAA TGGAGCGCGC
1251 GGGCAGCTGT GAATACCAAG TCAATGCTCC TCEGGTAAGG GTCTCGCCGA
1301 ACATTTTCAA CAAGATGGAG GAGACTTGTT CTTTGGAGAG ATCATTGCCC
1351 TTTACCGCAG TGACATAATG ATTACATGAT CTTCCGGGTC GGTCGTACCA
1401 TCATAAATTT TCAGATAAGG TGGCATCTTG AACGTCTTGG GTATGGCATA
1451 TGGGGCGGCT TCATCACTGT AGGGTTGCTC GACTAACCGA CCAGCGTCTC
1501 TTTTGGGAAA TATTTTGGG GCACCCGGTA TTTTATCGAC TCTTTCTTGG
1551 TGTTCTCTCA TTTGATCCCG AAGCATTTTA TTTTCGTTTT CCATTTCTTC
1601 CATTTTCTTC AGAATGGCCG TGAGGGTGTC ATTACCTGCA TTATTAATAT
1651 TGTGAGTGAT ACCTGTTACT GAAGGGGGAG GGTCTGTGCTG TTTGGTCATT
1701 GCTGGTGCAA TGCAAGTCCT TGCATTTTCT CTAAATACCT CCTGAGTGGG
1751 TTTGTTGAGG ATGCCGGTCA GCATATTTGT CAGCCAAGCT TCGAGTAGCT
1801 TCTTCACCGC TGGTGGCGCC TCTTCCGTTG TGGACGTGGA AGCTCCTTTA
1851 CCGCGGGATG TTGCGATACT GCTGTGAGGG AGGGGTGATC CACTTCGTCTG
1901 GGGAGAGGTG TTAGGCGTTA TGCCTTCGCC TTCTATTTCTG GAGACCTCAT
1951 TGATGGTGTT TAAGAGGTTG GTAGTGAGAT TGGCCACTGC CTTCATCCTT
2001 TCTTCTCCCT TACCTGCCAT GTCAGATCTG GGTGTACAAG GAAGTAGGAG
2051 CTTCTCTTCT TCTTTTTTGT GAATTGTGCC AGTTATAGAT CTAAAAGAAA
2101 CTAAAGTTTT AACTAGACTA TCCTCACAGA CGGCGCGAAA TTGTTTGACC
2151 AAAAAATATA GACTTTTGAT TAAATTAATT AATATTGTAT GACAAAGGAT
2201 TAAACCTAGT TAATGATAAT AACTTCAGAT CTATAATCAA TTAACAGCAA
2251 TCACGGTCAT AGCAGCGTTG AGAGAAGATT AAATGTGATG TnCATTC AAT
2301 ATTTCAAGAT CATTAAATGAT AGGGGAATAT CAAGCAATAA ATAACGATAA
2351 ATGGCATTAA AGTAAATAAG GAGAATGATT CACCCAATAT TGAATGAGGT
2401 GGATGATTCT TCTTTTTGAC AATGATGAAT GATGGnCAA TACTAGAATG
2451 TTGGGACCCT TCTCGGATCT AATGAAAAAA GTATGGAATA GTAGATAATC
2501 GAATCTCTTT AGAAAGGTAG TGATTGTCTT TTATCTAGAG AGAAAGTCTG

```

12.08.99

8

2551 CTTTTCAAAG AATATTTTTTA TCAGAGAATA TTACATCCCC CTCTCTCCCT
2601 ATnTCTTTTT CTATTTATAT GGGACATTCC TCAATCAATC CTAAAAGTAC
2651 ATACACCAAG AATATTCAAT AAAATATTTT TTTGAATATT CTATTATAAA
2701 AACTAGCTGT TAGCACTCGA CCTCGGTCGn TATTGACTAC TCGGTTACGA
2751 GCCCTGTCTAT TTACTAATCG ACCTCGATTA CATCACTTTC TACGATACTG
2801 CTTTCATGTCA AATCTTAATG AAAGCAGATT TTGACCCATA CAATAATATG
2851 ACAAATTGC TTCCAAAGAA AACATGGCTC TTATAGTGAA ATATCGTTAG
2901 ACTGTTATAG AAAGATCTGA ATTTATTTAT AAGAATAGTG TTTTTTCTT
2951 TTCTTTTCAT ATCTAAGGAG TAAAGCAACC ATGAATAGAA AAGGCTTAGT
3001 AACTATATAT CAAAGGAATG GTGTTTTTTC TTTAAATATG GATAAAAATT
3051 TGTGAATATA GAAGATTAGA TCAATTAACA AAGGTTATGG TGGAGTGTA
3101 AGCAGAGGCG GACCTATGTG TTATAGTAAG GGGTCACCCA CTACTAGAAA
3151 TCCGGTAAAG ATCGATCAA AAACCGACCA ACATTGGTCG GTAATGGCCA
3201 AAAACTGACC AAAACGCGAT CATTTACGTG TGAACGGTAT TTTTATGGTC
3251 GGAAAGGAAT ACCGACCAA GTTGGTCGGA AATTACCGAC CAACTTTGGT
3301 CGGTCAATTA AATTCAAAA AAATATTGTA AAAAAAACC GACCAAAGTT
3351 GATCGGTATT TTAATTATGT AATAAAAAGA TTCACTATCT GGAATCGAA
3401 CCGGGGTCTG TACTATGGCA AGATACTATT CTACCACTAG ACCATTGGTT
3451 CATTTTGTTT TAAGACTGTC TTTTATTTGA TTTATACTCT TTAATTATAT
3501 TTTTGCACGA AAATAACCGA CCAAAGTTGG TCGATTTTAT TAAAAAGTAA
3551 AATTACTTAC CAAAGTTGGT CGATTTTTTT AAATGATCCG CCGAATTAAC
3601 CGACCAATTT TGGTAGGTTT TTTTAATATT AATTTTTTAT TATTTTAATT
3651 GAAAAACTAA CCAAAGTTAG TCGGTTTCTT GAAACATAAA TTTCGCGGGA
3701 CTCAAAAATA GTTTCCCGCA TTTTTCGCGC AAAGAAAACC GACCAAAGTT
3751 GGTCGGTTTC GTAAAAAAA AAAAAATTTA AAAAATATAT TTTAAAAAAC
3801 CGACCAACTT TAGTCGGTTT TTTGGTCGAT TTTTTCGACG ACCAAAGTTG
3851 GTCGGTCGAC CTTGGTCGGT TTTTGCCGAA TTTCTAGTAG TGACCGAACC
3901 CTGTAAGCTT CGGGAGAAAT TTTGTATATG TATATGTGTA TATCCTTAAA
3951 ATGATTAATT TAAAGAACGn nGCACCCTGA ATACTAGAAG CCTTTAGGGG
4001 CACTAGATGA GCAGAATAAC GTGTTCTCGT CGCGTAAAAA TACTTGATC
4051 CGCCTATGAT GGTAAGTACT TCTTCGTCCT TAATCAGAGG TTTCGACTTC
4101 GAGCTCCAGA TATAAACTAT AGACTCGTCT TTATAGCACC TTTAATAAG
4151 ACTATGACTT CATCTGATTT CTCTATAAAT ACTCCTCAAG CTTTCGGTTC
4201 TTCTCCATTG TTCAGTTTCT TTCTCCACAT CACAGAAGTG AAAACAAAAC
4251 AAGAAGAAGA AGAAGAAGAA AAATAAAGAG TTTCTGTCAA ATTAAGTCCA
4301 ATAGGGAAAA TG

12.08.99

9

Ansprüche

1. Promotorsystem, gekennzeichnet durch einen Klon aus genomischen DNA-Sequenzen.
2. Promotorsystem, gekennzeichnet durch Expressionskassetten.
3. Verwendung eines Promotorsystems nach Anspruch 1 oder 2 zum Beeinflussen eines Genes.
4. Verfahren zur Herstellung eines Promotorsystems nach Anspruch 1 oder 2.
5. Verfahren zum Experimentieren mit einem Promotorsystem nach Anspruch 1 oder 2.